

**DETERMINASI URUTAN NUKLEOTIDA PADA PLASMID
MITOKONDRIA *Paramecium caudatum* stok GT704**

Trina E. Tallei*

Maelita R. Moeis** dan Hiroshi Endoh***

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan urutan nukleotida dari DNA plasmid pada mitokondria dalam *P. caudatum* stok GT704 dalam rangka mengidentifikasi produk-produk gen potensial dan juga yang bertanggung jawab dalam pemeliharaan DNA itu sendiri di dalam mitokondria. Metoda yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolasi DNA, cloning dan sekuensing dan diikuti dengan analisis urutan-urutan nukleotida yang didapat dengan menggunakan program yang tersedia secara on line di internet. Dimer-dimer ditemukan mudah berdisosiasi menjadi monomer apabila diperlakukan dalam kondisi panas dengan kekuatan ion yang rendah. Dimer-dimer tersebut dapat distabilkan dengan cara ligasi. Hasil ini menunjukkan bahwa masing-masing monomer mempunyai suatu ujung lengket *sticky* yang komplementer antara monomer-monomer yang sejenis sehingga dapat membentuk dimer, dengan meninggalkan suatu *nick* yang dapat diligasi dengan menggunakan ligase. Urutan-urutan nukleotida dari beberapa DNA plasmid tersebut telah ditentukan secara acak. Hasil analisis urutan-urutan nukleotida memperlihatkan bahwa DNA dimer mempunyai 2 ORF yang mengkode RNA polimerase putatif. Diasumsikan bahwa asal mula DNA plasmid ini adalah elemen yang dapat berpindah atau semacam virus lainnya karena urutan-urutan nukleotida dari motif EVI-1 *ectopic viral integration site*-1 ditemukan. Diasumsikan juga bahwa DNA plasmid ini dapat berintegrasi ke mtDNA karena mempunyai urutan-urutan nukleotida yang homolog dengan mtDNA dari beberapa siliata.

Kata kunci : *Paramecium caudatum*, plasmid linier, mitokondria, RNA polimerase putatif

* Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung, Jl. Raya Bandung-Sumedang Km 21 Jatinangor, email : trina@melsa.net.id

** Jurusan Biologi FMIPA ITB, Jl. Ganesha 10 Bandung, email : maelita@bi.itb.ac.id

***Jurusan Biologi Fakultas Sains Universitas Kanazawa Jepang, email: hendoh@kenroku.kanazawa-u.ac.jp

MITOCHONDRIAL PLASMID IN *Paramecium caudatum* STOCK GT704

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the sequence of mitochondrial plasmid-like DNA in *P. caudatum* stock GT704 in order to identify potential gene products and other nucleotide sequences that might have relationship with integration of DNA and also the maintenance of DNA itself in mitochondria. The methods used in this study were isolation of the DNA, cloning and sequencing then followed by analysis of sequences obtained using available internet on-line programs. The dimers were found to be easily dissociated to monomers when treated with heat under conditions of low ionic strength. The dimers were stabilized by ligation. These results suggest that each monomer has a sticky end of single-stranded DNA that has complementary nucleotide sequences, and so attaches to each other at the end by base-pairing to form a dimer, leaving a nick that can be filled by ligation using ligase. Nucleotide sequences of some part of the DNA have been obtained randomly. Sequence analysis suggest that these dimer DNAs have 2 ORFs that code for putative RNA and DNA polymerase. It is assumed that the origin of this mitochondrial plasmid-like DNA is transposable element or some viruses since the motif EVI-1 (ectopic viral integration site-1) was found in the sequence. It is also assumed that this DNA can integrate into mtDNA since it also has some sequences that are homolog to the sequences of mtDNA of some ciliates.

PENDAHULUAN

Plasmid mitokondria telah umum ditemukan pada fungi dan tanaman tingkat tinggi, tetapi sangat jarang ditemukan pada eukariota lainnya seperti pada hewan. *Paramecium* adalah contoh pertama di mana suatu DNA menyerupai plasmid pada mitokondria ditemukan di antara siliata. Dalam stok alamiah, *P. caudatum* mempunyai satu dari tiga tipe DNA plasmid yaitu tipe I (6,4 kb), tipe II, merupakan suatu kumpulan dari 4 macam DNA plasmid (8,2 ; 4,1; 2,8 ; dan 1,4 kb) dan tipe III (8,6 kb). *Paramecium caudatum* stok GT704 hanya memiliki DNA plasmid tipe II. DNA plasmid 8,2 dan 2,8 masing-masing merupakan dimer dari 4,1 dan 2,8 kb.

Berbagai plasmid dalam mitokondria telah dilaporkan ditemukan pada tanaman tingkat tinggi dan jamur, sedangkan penemuan plasmid pada mitokondria dari protozoa bersilia *Paramecium* merupakan contoh pertama dalam eukariota selain yang telah disebutkan di atas (Endoh *et al.*, 1994). Kehadiran dari beberapa plasmid, seperti plasmid *kalilo* dan *maranhar* dalam *Neurospora*, berhubungan dengan senesen. Proses degeneratif ini dihasilkan dari bermacam-

macam mutasi dalam genom mitokondria (mtDNA) dan dikarakteristikan dengan lambatnya pertumbuhan, kehilangan fertilitas dari organisme betina, dan cacat mitokondria seperti defisiensi sitokrom aa3 dan b. Senesen juga diinduksi dengan integrasi plasmid-plasmid linier tersebut ke dalam genom mitokondria. Pada gilirannya kematian organisme disebabkan oleh akumulasi superesif dari mtDNA defektif yang mengambil alih fungsi mitokondria normal (Court and Bertrand, 1992).

Plasmid-plasmid yang telah diteliti dengan sangat mendalam adalah plasmid linier *kalilo* dan *maranhar*. Plasmid-plasmid tersebut mempunyai karakteristik sebagai berikut : Pertama, mempunyai suatu *terminal inverted repeat* (TIR). Kedua, pada masing-masing ujung DNA terdapat protein yang berikatan dengan nukleotida 5'. Ketiga, dimulai dari tengah-tengah *terminal repeat*, ada dua *open reading frame* (ORF) besar yang tidak tumpang tindih satu sama lain. *Reading frame* ini hanya bisa terbuka apabila digunakan kode genetik khusus untuk mitokondria (Griffiths, 1995). Menurut beberapa data hasil urutan nukleotida, ORF tersebut mengkode DNA polimerase dan RNA polimerase dan juga yang diperlukan untuk replikasi plasmid-plasmid itu sendiri (Oeser and Tudzynski, 1989; Chan *et al.* 1991; Hermanns and Osiewacz, 1992).

Menurut Endoh *et al.* (1994), plasmid yang ditemukan pada mitokondria *Paramecium* dapat dibagi atas dua kelompok: pertama (disebut sebagai tipe I), terdeteksi sebagai suatu pita tunggal dan yang kedua (disebut sebagai tipe II), terdeteksi sebagai satu kumpulan dari empat pita dalam gel elektroforesis. DNA tipe I tidak hanya terdapat pada *Paramecium caudatum*, akan tetapi juga pada spesies *Paramecium* lainnya. Plasmid pada *P. caudatum* kelihatannya mempunyai ciri khusus yang sama dengan plasmid-plasmid linier lainnya yaitu mempunyai suatu protein terminal pada salah satu ujung dan *hairpin* pada ujung lainnya. Lebih lanjut lagi, DNA tipe II sangat jarang ditemukan pada stok alamiah dari *P. caudatum*. Sampai sekarang, sangat sedikit ditemukan informasi tentang struktur dari DNA tipe II ini (Endoh *et al.* 1994, Tsukii, 1993).

Struktur molekuler dari DNA yang menyerupai plasmid tipe II yang diisolasi dari mitokondria *P. caudatum* telah dikarakterisasi. DNA ini selalu terdeteksi sebagai suatu kumpulan dari empat macam ukuran yaitu 8,2; 4,1; 2,8 dan 1,4 kb. DNA dari 8,2 kb dan 2,8 kb berada dalam bentuk dimer yang terdiri dari molekul-molekul monomer masing-masing 4,1 kb dan 1,4 kb. Pemeriksaan mikroskop elektron menandakan konfigurasi dari suatu struktur *hairpin* yang mempunyai ujung *protruding* dari DNA rantai ganda pada satu ujung dan satu *loop* pada ujung lainnya. Monomer-monomer bersatu dengan cara berpasangan dalam arah yang berlawanan pada ujung *protruding* untuk membentuk dimer. Dimer yang tidak biasa ini mungkin mempunyai suatu tugas dalam replikasi dari DNA di mana monomer yang satu bertindak sebagai suatu primer bagi monomer lainnya (Endoh *et al.*, 1994)

Tujuan penelitian ini adalah menentukan urutan nukleotida dari plasmid yang terdapat dalam mitokondria *Paramecium caudatum* stok GT704 untuk

mengidentifikasi produk-produk gen yang terlibat dalam proses pemeliharaan diri plasmid tersebut dan menentukan urutan nukleotida yang terlibat dalam proses integrasi atau delesi.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Genetika Fakultas Sains Universitas Kanazawa Jepang.

Isolasi mitokondria dan DNA plasmid

Prosedur isolasi mitokondria dilakukan berdasarkan metode standar (Goddard and Cummings, 1975) dengan sedikit modifikasi. Pelet mitokondria dilisis dalam TE pH 8 dan proteinase K selama 3 jam suhu 50°C. DNA diperoleh dengan ekstraksi fenol. DNA total yang dihasilkan diperiksa untuk memastikan apakah mengandung DNA plasmid seperti yang diharapkan. DNA dimer diisolasi dari gel dengan menggunakan DNA Purification System (Bio-Rad). DNA dimer lalu di potong dengan *Hind*III dan disisipkan pada vektor pBluescript SK (+/-) vektor fagamid dan pT7Blue kemudian dilakukan proses transformasi.

Analisis Urutan Nukleotida

DNA yang digunakan untuk pengurutan nukleotida adalah DNA yang dimurnikan dengan *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). Alat penentu urutan nukleotida DNA yang digunakan adalah ALOKA DNA sequencing system Model LIC-420 OL (S)-1. Reaksi penentuan urutan nukleotida DNA adalah sebagai berikut: DNA templat; IRD800 labeled-primer (M13 forward atau M13 reverse); 10 X sequencing buffer; dNTP (Amersham); Thermo Sequenase TM DNA polymerase; dan ddH₂O dan dilakukan proses PCR sebagai berikut : denaturasi awal pada 95°C selama 5 menit, denaturasi pada 95°C selama 30 detik, annealing pada 50°C selama 30 detik dan polimerisasi pada 70°C selama 60 detik. Keseluruhan siklus yang digunakan adalah 30.

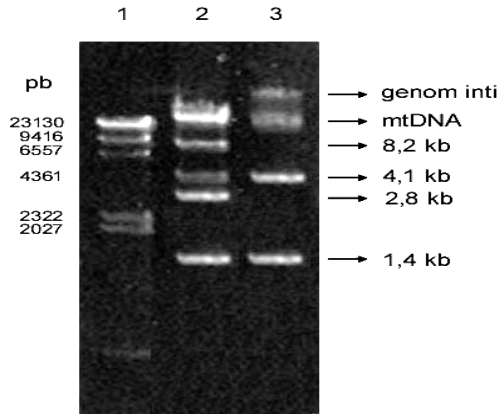
HASIL

Struktur Dimer

DNA yang diekstraksi dari fraksi mitokondria *Paramecium caudatum* dielektroforesis (Gambar 1). Terlihat pada gambar bahwa terdapat satu kumpulan DNA plasmid selain DNA mitokondria dalam mitokondria *P. caudatum*. DNA plasmid ini disebut sebagai tipe II (selanjutnya disebut plasmid pGT704-8,2 yang berukuran 8,2 kb; pGT704-4,1 yang berukuran 4,1 kb; plasmid pGT704-2,8 yang berukuran 2,8 kb; dan plasmid pGT704-1,4 yang berukuran 1,4 kb), sama dengan yang ditemukan oleh Endoh *et al.* (1994) pada stok Hrp2 dan 703s18.

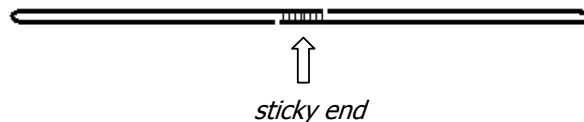
Determinasi Urutan Nukleotida pada Plasmid Mitokondria *Paramecium caudatum* stok GT704 (Trina E. Tallei dkk.)

Diperkirakan dalam hasil ini bahwa DNA 8,2 kb dan 2,8 kb adalah masing-masing dimer dari monomer 4,1 kb dan 1,4 kb. Dimer-dimer ini mudah berdisosiasi menjadi monomer apabila diinkubasi pada kondisi panas dengan konsentrasi ion yang rendah. DNA dilarutkan dalam TE (10 mM Tris -HCl pH 7.5) dan 1 mM EDTA dan diinkubasi selama 5 menit pada 65°C. Hasil ini menandakan bahwa kemungkinan pada masing-masing monomer terdapat suatu *sticky end* yang mempunyai urutan nukleotida yang komplemen sehingga masing-masing komplemen dapat berikatan pada masing-masing ujung dan membentuk dimer (Gambar 2)



Gambar 1 DNA *Paramecium caudatum* dari fraksi mitokondria 1 : DNA penanda (λ HindIII); 2 : DNA total sebelum pemanasan, yang terdiri dari DNA mitokondria, plasmid pGT704-8,2 yang berukuran 8,2 kb; pGT704-4,1 yang berukuran 4,1 kb; plasmid pGT704-2,8 yang berukuran 2,8 kb; dan plasmid pGT704-1,4 yang berukuran 1,4 kb; 3 : DNA total setelah pemanasan pada 65°C, yang terdiri dari DNA mitokondria, 4,1 kb dan 1,4 kb.

Dalam penelitian ini ditemukan bahwa dimer 2,8 kb dan 8,2 kb menjadi stabil setelah diligasi. Ini menandakan bahwa pembentukan dimer terjadi dengan meninggalkan *nick* dan bukan *gap* antara monomer-monomer. *Nick* dapat diligasi dengan ligase sedangkan *gap* tidak dapat diligasi.



Gambar 2 Struktur Dimer Plasmid pada Mitokondria *P. caudatum* (Endoh *et al.*, 1994)

Pada percobaan dengan menggunakan vektor pBluescript ditemukan DNA sisipan yang berukuran sekitar 0,8 kb dari fragmen 8,2 kb (selanjutnya disebut klon for8-2a) dan sekitar 0,4 kb dari fragmen 2,8 kb (selanjutnya disebut klon for2-8a). Pada percobaan dengan vektor pT7blue, ditemukan beberapa ukuran DNA sisipan, yaitu yang berukuran sekitar 200 pb (selanjutnya disebut klon for8-2-3), 1,2 kb (selanjutnya disebut klon for8-2-4), 700 pb (selanjutnya disebut klon for8-2-5) dan 0,4 pb (selanjutnya disebut klon for 8-2-7) dari fragmen 8,2 kb dan sekitar 4 kb dari fragmen 2,8 kb (selanjutnya disebut klon for2-8-2).

Analisis Hasil Penentuan Urutan Nukleotida

Untuk mengidentifikasi kemungkinan fungsi-fungsi dari protein yang dikode oleh ORF pada masing-masing klon, urutan asam amino dari protein putatif dibandingkan dengan sekuens pada GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>).

Secara keseluruhan, hasil penentuan urutan nukleotida dari DNA plasmid ini mempunyai komposisi basa sebagai berikut : A=1120 ; C=628; G= 638; dan T=1264 sehingga AT = 65,4 %, mendekati mtDNA protista (> 70%) (Gray *et al.*, 1998). Hasil-hasil urutan nukleotida dari masing-masing klon telah ditranslasi dengan menggunakan kode genetik mitokondria Protozoa, di mana kodon *start* adalah ATG, kodon *stop* adalah TGA, sedangkan TAA dan TAG mengkode glutamin.

Urutan Nukleotida pada Dimer 2,8 kb

Klon-klon yang merupakan fragmen dari dimer 2,8 kb adalah klon for2-8a dan for2-8-2 (Tabel 1). ORF-1 for2-8a menghasilkan sitokrom *b* putatif yang mirip dengan sitokrom *b* dari *Trigona necrophaga* (homologi : 52%). ORF-2 for2-8a menghasilkan DNA-directed RNA polymerase putatif yang homolog dengan sekuens pada plasmid-plasmid mitokondria *Pleurotus ostreatus* (74%), *Hebeloma circinans* (75%), *kal* dari *Gelasinospora* sp. (54%), *Neurospora intermedia* (54%), *Podospora anserina* (55%), *Flammulina velutipes* (70%), pAL2-1 dari *Podospora anserina* (53%), *Agaricus bitorquis* (59%), T7-like RNA polymerase dari *Pylaiella littoralis* (50%). ORF-3 for2-8a menghasilkan DNA-directed RNA polymerase putatif yang homolog (50%) dengan sekuens pada plastid *Plasmodium falciparum*.

Tabel 1 Analisis Hasil Penentuan Urutan Nukleotida Dimer 2,8 kb

Klon	Panjang DNA sisipan (kb)	Panjang nukleotida yang terbaca ((pb)	Nama ORF	Letak ORF (No. nukleotida)	Panjang Asam Amino
Klon for2-8a	0,4	388	ORF-1 * [@]	112 – 369	84
			ORF-2 [@]	84 – 387	101
			ORF-3 [@]	312 – 1	104
			ORF-4 [@]	236 – 3	78
Klon for2-8-2	4,0	780	ORF-1*	235 – 462	75
			ORF-2*	89 – 280	63
			ORF-3	368 – 778	137
			ORF-4	2 – 149	48
			ORF-5	444 - 779	112
			ORF-6	147 - 1	49
			ORF-7*	606 - 328	92
			ORF-8*	272 - 144	42
			ORF-9*	779 - 636	47
			ORF-10	778 - 356	135

Keterangan : * = ORF lengkap (ada kodon inisiasi dan terminasi)
[@] = Protein yang dikode ORF homolog dengan protein lain (>50%)
 kb = kilobasa
 pb = pasang basa

Urutan Nukleotida pada Dimer 8,2 kb

Klon-klon yang merupakan fragmen dari dimer 8,2 kb adalah klon for8-2a, for8-2-3, for8-2-4, for8-2-5 dan for8-2-7 (Tabel 2). Dari semua ORF pada for8-2a, hanya ORF-9 for8-2a yang mengkode protein putatif dengan fungsi yang berarti, yaitu DNA polimerase alpha putatif yang homolog (52%) dengan protein yang serupa pada *Plasmodium falciparum*. Polipeptida yang dikode oleh ORF-2 for8-2-3 homolog (65%) dengan sitokrom-c oksidase homolog 043L pada *Chilo iridescent virus*. Polipeptida yang dikode oleh ORF-4 for8-2-3 homolog (59%) dengan subunit beta RNA polimerase dari *Toxoplasma gondii* dan *Neospora caninum* (54% homologi).

ORF-1 for8-2-4, polipeptida yang dikodenya homolog (57%) dengan ORF276 dari *Tetrahymena pyriformis*. Polipeptida yang dikode ORF-2 for8-2-4 homolog (78%) dengan ORF168 dari *Paramecium aurelia*.

Polipeptida yang dikode oleh ORF-1 for8-2-5 ini homolog dengan sitokrom c oksidase rantai II dari mitokondria *Paramecium aurelia* (95%), *P. tetraurelia* (93%), *P. primaurelia* (93%), dan *Tetrahymena pyriformis* (72%). Polipeptida yang dikode oleh ORF-2 for8-2-5 homolog dengan subunit 4 NADH dehidrogenase dari mitokondria *Acanthamoeba castellanii* (50%). Polipeptida yang dikode oleh ORF ini homolog dengan NADH-Ubiquinon oksidoreduktase subunit 20 kDa dari

mitokondria *Paramecium tetraurelia* (99%), fotosistem II protein G dari mitokondria *Paramecium aurelia* (99%), NADH dehidrogenase subunit 10 dari *Paramecium aurelia* (99%), dan NADH dehidrogenase subunit 10 dari *Tetrahymena pyriformis* (95%). Polipeptida yang dikode oleh ORF-3 for8-2-7 homolog dengan fotosistem II protein G dari *Paramecium aurelia* (99%), NADH-ubiquinon oksidoreduktase prekursor subunit 19,3 kDA putatif dari mitokondria *Neurospora crassa* (99%), NADH dehidrogenase subunit 10 *Tetrahymena pyriformis* (99%), protein psbG *P. tetraurelia* (92%).

RNA dan DNA polimerase

DNA-*directed* RNA *polymerase* (RNAP) merupakan enzim yang diperlukan dalam proses transkripsi. RNAP dari bakteriofag T7 (100 kD) tidak memerlukan faktor lain untuk pengenalan promoter dan merupakan polipeptida tunggal. Menurut Griffiths (1995), karakteristik dari plasmid linier antara lain adalah adanya ORF yang mengkode satu *virus-type* DNA polimerase dan satu RNA polimerase yang mirip dengan RNA polimerase bakteriofag dan mitokondria ragi.

Tabel 2 Analisis Hasil Penentuan Urutan Nukleotida Dimer 8,2 kb

Klon	Panjang DNA sisipan (kb)	Panjang nukleotida yang terbaca (pb)	Nama ORF	Letak ORF (No. nukleotida)	Panjang Asam Amino
Klon for8-2a	0,9	688	ORF-1*	115 - 219	34
			ORF-2	2 - 199	65
			ORF-3	581 - 688	36
			ORF-4*	99 - 254	51
			ORF-5	456 - 686	62
			ORF-6	688 - 551	45
			ORF-7	687 - 586	33
			ORF-8	116 - 3	38
			ORF-9*®	554 - 180	109
Klon for8-2-3	0,2	213	ORF-1*	15 - 155	46
			ORF-2®	195 - 1	65
			ORF-3	212 - 3	70
			ORF-4®	211 - 2	70
Klon for8-2-4	1,2	565	ORF-1*®	259 - 375	38
			ORF-2®	2 - 262	86
			ORF-3	407 - 565	53
			ORF-4	3 - 140	45
			ORF-5	385 - 2	128
			ORF-6	258 - 1	81
			ORF-7	200 - 1	66
			ORF-8	563 - 432	43
Klon for8-2-5	0,7	612	ORF-1*®	49 - 387	112
			ORF-2®	137 - 610	158
			ORF-3*®	573 - 364	69
Klon for8-2-7	0,4	414	ORF-1	11 - 412	134
			ORF-2	282 - 413	43
			ORF-3®	119 - 3	39
			ORF-4*®	290 - 129	55
			ORF-5	283-1	94

Keterangan : * = ORF lengkap (ada kodon inisiasi dan terminasi)

® = Protein yang dikode ORF homolog dengan protein lain (>50%)

Pada penelitian ini ditemukan RNAP putatif dan "T7 like RNA polymerase" pada klon for2-8a dan RNA polimerase subunit β pada klon for8-2-3. Court and Bertrandt (1992) menemukan bahwa residu 417 – 828 dari sekuens plasmid linier *maranhar* homolog dengan polipeptida dari RNA polimerase mitokondria raji, bakteriofaga T3 dan plasmid S-2 dari jagung, pCIK1, *kalilo*, dan pEM dari *Agaricus bitorquis*. Pada penelitian ini ditemukan bahwa RNA polimerase putatif yang dikode oleh plasmid pada mitokondria *P. caudatum* stok GT704 homolog dengan bakteriofaga T7 (termasuk dalam bakteriofaga T ganjil) dan *Agaricus bitorquis*. Dalam kelompok RNA polimerase ini, sejumlah motif yang terkonservasi telah diidentifikasi (Chan, *et al.*, 1991 dalam Court and Bertrandt, 1992).

Pada RNA polimerase T7 yang telah dikarakterisasi dengan baik, motif-motif tersebut ditemukan dalam suatu fragmen proteolitik yang tidak mempunyai asam amino 172 N-terminal akan tetapi masih mempunyai aktivitas katalitik. Dengan demikian, menurut Chan *et al.* (dalam Court and Bertrandt, 1992), kehadiran dari motif-motif ini, yaitu motif I sampai dengan XII, menandakan RNA polimerase tersebut fungsional.

Pada plasmid *maranhar* hanya ditemukan 10 motif, yaitu motif III sampai dengan XII. Pada plasmid GT704-2,8 ditemukan 2 motif seperti tertera pada Gambar 3. Program yang digunakan untuk pencarian motif adalah Multalin Versi 5.4.1 (<http://protein.toulouse.inra.fr/multalin.html>), dengan simbol konsensus sebagai berikut: ! adalah I atau V (I = Isoleusin, V = Valin), \$ adalah L atau M (L = Leusin, M = Metionin), % adalah F atau Y (F = Fenilalanin, Y = Tirosin) dan # adalah N,D,Q, atau E (N = Asparagin, D = Asam aspartat, Q = Glutamin, E = Asam glutamat). Meskipun kenyataan bahwa *maranhar* dan *kalilo* ditemukan pada spesies dalam genus *Neurospora*, urutan asam-asam amino dalam RNA polimerasenya tidak berhubungan erat. Dalam kenyataannya urutan asam-asam amino RNA polimerase *maranhar* lebih mendekati RNA polimerase dari T3 dan bahkan dalam ke sepuluh motif-motif terkonservasi yang ditemukan, urutan asam-asam amino pada RNA polimerase *maranhar* dan *kalilo* tidak mirip sama sekali (Court and Bertrandt, 1992).

				Motif X	
FOR28aRPOL			IYDYD	EKSSI NSLEA	NNLHKIDALL
P-ostreatus	VRTNMLKSSK	PITILVPTDS	LDYSSIKTGL	MPNFI HSLDA	SNIHMLINLI
F-velutipes	IKTSLIKNVN	PIGIVPMEQ	MDYRSMNGL	MPNLI HSLDA	SNIHILVNNI
P-anserina	MKPFNHSNKK	FSMKVLNKTQ	FNNSKQITAF	MPNLVHSLDA	ASLTLLDFY
H-circinans	VKPSLIKKSK	PISILIPTEV	IDYPKIKLGL	MPNFI HSLDA	SNIHLLISNI
Consensus	.k.....k		I....	mpn. ! hSL#A	.nh.l....
				Motif XI	
FOR28aRPOL	VKH..VLEVL	DVITIHDCEG	TRIKDVAKLI	DVV..NIYYQ	RYTSND....
P-ostreatus	IQL..QIKNM	NLYTIHDCFA	TDYKNIFALL	EILIKKSFTD	IYFNKYLDF
F-velutipes	IKYYGNVNL	NLYTIHDCFA	TDYKNM.KII	EILVRLSFIE	LYFNKYDLEI
P-anserina	FKE..SIDVK	NLYTIHDCFA	VPANKMECTI	SLL.KLTYIK	LYSDDKYLLK
H-circinans	NKY..NLKDL	NLYTIHDCFA	SDYKNI.AII	ELLVKHSFIE	LYFQVDYLEA
Consensus	.K...l.vl	#.yTIHDCFa	T...k...I	..l.k...%I.	Ly...dyl..

Gambar 3 Perbandingan Urutan Asam-asam Amino dari Protein yang Dikode oleh ORF-2 dari plasmid pGT704-2,8 dengan RNA Polimerase dari Plasmid-plasmid pada *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes*, *Podospora anserina*, dan *Hebeloma circinans*. Motif X dan XI ditemukan berdasarkan program Multalin versi 5.4.1. Simbol konsensus yang digunakan adalah: ! adalah I atau V (I = Isoleusin, V = Valin), \$ adalah L atau M (L = Leusin, M = Metionin), % adalah F atau Y (F = Fenilalanin, Y = Tirosin) dan # adalah N,D,Q, atau E (N = Asparagin, D = Asam aspartat, Q = Glutamin, E = Asam glutamat) (<http://protein.toulouse.inra.fr/multalin.html>).

Motif-motif yang ditemukan pada plasmid pGT704-2,8 sesuai dengan motif-motif yang kemukakan oleh Oeser and Tudzynski (1989, dalam Court and Bertrand, 1992), dengan simbol konsensus sebagai berikut: b = asam amino bercabang (I = Isoleusin, L = Leusin, dan V = Valin), p = asam amino bermuatan positif (K =Lisin, R = Arginin, dan H = Histidin), n = asam amino bermuatan negatif, (E = asam glutamat, S = Serin, D = asam aspartat, N = asparagin), f = asam amino aromatik (F Y), dan g = G (glisin) atau A (asparagin atau asam aspartat).

Motif yang terkonservasi menurut para peneliti tersebut untuk motif X adalah PN-bHS-Dg, sesuai dengan motif yang ditemukan dalam penelitian ini, yaitu pn!hSL#A (Gambar 4).

Kemungkinan diperolehnya sedikit perbedaan pada motif-motif tersebut adalah plasmid-plasmid mitokondria yang digunakan sebagai acuan oleh Court and Bertrand (1992) adalah *kalilo*, *maranhar*, pCIK1, S-2, dan pEM, sedangkan yang digunakan acuan pada penelitian ini adalah RNA polimerase pada plasmid-plasmid mitokondria dari *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes*, *Podospora anserina* dan *Hebeloma circinans*. Alasan dipilihnya organisme-organisme tersebut pada penelitian ini karena DNA-*directed* RNA *polymerase* yang dikode oleh ORF 2-8a mempunyai homologi yang tinggi dengan protein dari organisme-organisme yang dipilih.

	V
	L A
	I G
(motif Oeser dan Tudzynski)	PN-bHS-Dg
(motif penelitian ini)	Pn !hSL#A
	I N
	V D
	Q
	E

Gambar 4 Perbandingan Motif X dari Penelitian ini dengan Motif yang Dikemukakan oleh Oeser dan Tudzynski (dalam Court and Bertrand, 1992)

Untuk motif XI, motif yang dikemukakan oleh Oeser and Tudzynski (1989, dalam Court and Bertrand, 1992) adalah bHDCF, dan motif ini sesuai dengan motif yang ditemukan dalam penelitian ini yaitu IHDCF (Gambar 5).

	V
	L
	I
(motif Oeser dan Tudzynski)	bHDCF
(motif penelitian ini)	IHDCF

Gambar 5 Perbandingan Motif XI dari Penelitian ini dengan Motif yang Dikemukakan oleh Oeser and Tudzynski (dalam Court and Bertrand, 1992)

Dugaan adanya DNA *polymerase alpha* putatif ditemukan pada klon for8-2a. DNA *polymerase alpha*, delta dan epsilon termasuk dalam kelas DNA polimerase tipe B, seperti halnya DNA polimerase II pada *E. coli*, polimerase pada virus-virus eukariota, dan pada bakteriofaga T4 (Cavarelli *et al.*, 1991). Pada penelitian ini, DNA polimerase yang ditemukan tidak mempunyai motif-motif yang sesuai dengan DNA polimerase tipe B sehingga tidak dapat disimpulkan bahwa protein tersebut adalah DNA polimerase.

Motif Evi-1 (Ectopic Viral Integration Site-1)

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh para peneliti di atas maka dapat ditarik suatu kesimpulan bahwa plasmid pGT704 menyerupai bakteriofaga linier rantai ganda, di mana pada situasi normal maka DNA ini tidak ditemukan dalam mitokondria. Akan tetapi apabila sel mencapai fase stasioner, maka DNA tersebut muncul. Fenomena ini menyerupai sifat-sifat virus lisogeni yang berusaha untuk menyelamatkan diri dengan cara keluar dari DNA inang pada situasi di mana virus-virus tersebut merasa keberadaan dirinya terancam. Dengan demikian, pada saat sebelum sel-sel *P. caudatum* mencapai fase stasioner maka plasmid terinsersi pada mtDNA inang, dan pada saat menjelang kematian sel, DNA tersebut keluar dari mtDNA dan membawa serta beberapa bagian DNA dari mtDNA.

Berdasarkan hasil yang ditemukan pada plasmid pGT704 di mana beberapa protein putatif yang dihasilkan dari ORF yang diperoleh mempunyai homologi yang sangat tinggi dengan gen-gen yang terdapat pada mtDNA siliata lainnya (*Paramecium* sp. dan *Tetrahymena* sp.), diduga bahwa DNA tipe II ini merupakan bagian yang terdelesi dari mtDNA. Hal ini diperkuat dengan ditemukannya motif Evi-1 (*Ectopic viral integration site 1 encoded factor*) pada klon for8-2a dan klon for8-2-7 (http://www.motif.genome.ad.jp/motif-bin/motif_markseq_transfac).

Berdasarkan urutan nukleotida pada mtDNA manusia yang dikemukakan oleh Anderson *et al.* (1981), pada daerah antara posisi nukleotidas 8469 dan 13447 terdapat delesi sepanjang 4977-bp yang umum terjadi yang proporsinya meningkat sesuai dengan bertambahnya umur. Diduga bahwa plasmid pGT704 mengikuti tingkah laku dari mtDNA manusia tersebut. Dikemukakan pula bahwa pada ujung-ujung nukleotida yang terdelesi terdapat *inverted repeat*. Plasmid *maranhar* dan *kalilo* juga mempunyai *terminal inverted repeat*, akan tetapi tingkah laku dari kedua plasmid tersebut bertolak belakang dengan plasmid pGT704 yaitu dapat berintegrasi ke dalam mtDNA sehingga seluruh plasmid tersebut terinsersi ke dalam mtDNA (Court and Bertrand, 1992), sedangkan plasmid pGT704 pada fase stasioner terdelesi dari mtDNA. Kemungkinan tingkah laku dari pGT704 mirip dengan plasmid-plasmid $\Delta ka1$ -1,4 dan $\Delta ka1$ -2,8 yang ditemukan pada mitokondria *Neurospora intermedia*.

A

Posisi	Query Database	skor
367..353	AAATAAAATAAGAA A NGATANGANWAGATA	85
Posisi	Query Database	skor
36..28	ACAAGATTA ACAAGATAA	89

B

Posisi	Query Database	skor
57..47	TGATAAAATAA AGAYAAGATAA	85

Keterangan : Y = pirimidin
W = *weak interaction* (A atau T)
N = A, C, G, T

Gambar 6 Motif Evi-1 (*Ectopic viral integration site-1*)
A. Evi-1 pada klon for8-2a
B. Evi-1 pada klon for8-2-7

Pada klon for8-2a, motif Evi-I tersebut berada pada posisi 367-353 dengan sekuens konsensus NGATANGANWAGATA dan 35-28 dengan sekuens konsensus ACAAGATAA, sedangkan pada klon for8-2-7, motif tersebut berada pada posisi 57-47 dengan konsensus AGAYAAGATAA (Gambar 6). Evi-1 pertama kali diidentifikasi sebagai suatu sisi integrasi dari *murine leukemia retrovirus*

Replikasi dari setiap DNA linier memerlukan suatu mekanisme khusus yang melibatkan ujung 5' dari genom dan sejumlah mekanisme lainnya. Berdasarkan analisis elektron mikroskop, mtDNA dari *Paramecium* (sekitar 40 kb) mempunyai loop yang *covalently-closed single-stranded* pada satu ujung dan suatu struktur terbuka pada ujung lainnya sehingga menyediakan suatu pola replikasi unik. Replikasi dapat berlangsung melalui *hairpin loop* sehingga menghasilkan suatu molekul dimer, yang kemudian diproses menjadi dua monomer yang *cross-linked*. Mekanisme restorasi dari sekuens terminal pada ujung terbuka masih belum diketahui. Dengan demikian kemungkinan besar bahwa monomer-monomer dari

Plasmid ini merupakan intermedia dari dimer-dimer pada saat replikasi berlangsung.

Plasmid mungkin mewakili unit terkecil dari parasit dalam kehidupan ini. Parasit yang sempurna akan bertahan hidup dengan harmonis dengan inangnya, dan ini kelihatannya merupakan strategi dari plasmid *kalilo* dari *Neurospora tetrasperma* dan dalam *Gelasinospora*. Mungkin plasmid bahkan membawa beberapa keuntungan bagi inang. Bentuk virulen juga mewakili strategi harmonisasi parasit atau strategi agresif untuk membunuh dan berpindah ke inang selanjutnya.

Diduga asal usul plasmid pGT704 adalah elemen yang menyerupai transposon atau virus karena adanya motif EVI-1 (*ectopic viral integration site-1 encoded factor*), yang kemudian elemen tersebut terdelesi dari mtDNA karena hanya ditemukan pada fase stasioner dari pertumbuhan *P. caudatum*. Hal ini sejalan dengan penemuan delesi 4997-pb pada mtDNA manusia yang sejalan dengan meningkatnya umur manusia. Hal ini diperkuat dengan ditemukannya motif Evi-1 pada klon for8-2a dan klon for8-2-7, serta ditemukannya beberapa ORF yang mempunyai homologi sangat tinggi dengan yang terdapat dalam DNA mitokondria kelompok siliata lainnya, yaitu gen NADH subunit 10. Pada mtDNA manusia, daerah yang terdelesi adalah urutan nukleotida yang terdapat didalamnya gen yang mengkode NADH subunit 6.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil-hasil yang ditemukan pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

- Dimer-dimer ditemukan mudah berdisosiasi menjadi monomer apabila diperlakukan dalam kondisi panas dengan kekuatan ion yang rendah.
- Dimer-dimer tersebut dapat distabilkan dengan cara ligasi. Hasil ini menunjukkan bahwa masing-masing monomer mempunyai suatu ujung lengket (*sticky*) yang komplementer antara monomer-monomer yang sejenis sehingga dapat membentuk dimer, dengan meninggalkan suatu *nick* yang dapat diligasi dengan menggunakan ligase.
- Hasil analisis urutan-urutan nukleotida memperlihatkan bahwa DNA dimer mempunyai 2 ORF yang mengkode RNA polimerase putatif.
- Diasumsikan bahwa asal mula DNA plasmid ini adalah elemen yang dapat berpindah atau semacam virus lainnya karena urutan-urutan nukleotida dari motif EVI-1 (*ectopic viral integration site-1*) ditemukan.
- Diasumsikan juga bahwa DNA plasmid ini dapat berintegrasi ke mtDNA karena mempunyai urutan-urutan nukleotida yang homolog dengan mtDNA dari beberapa siliata.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, S., Baukier, A.T., Barell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., and Schreier, P.H. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, Apr 9:290(5806):457-65.
- Cavarelli, J., Bomu, W., Liljas, L., Kim, S., Minor, W., Munshi, S., Muchmore, S., Schmidt, T., Johnson, J., dan Hendry, D.A. 1991. Crystallization and preliminary structure analysis of an insect virus with $T=4$ quasi-symmetry: *Nudaurelia capensis* virus. *Acta Cryst.* B47, 23-29
- Chan, B.S-H, Court, D.A., Vierula, P.J., Bertrand, H. 1991. The kalilo senescence-inducing plasmids of *Neurospora* is an invertron and encodes DNA and RNA polymerases. *Curr Genet.* 20: 225-237.
- Court, D.A and Bertrand, H. 1992. A Method for sequencing uncloned termini of linear plasmids. *Nucleic Acids Res.* 19:1714
- Endoh, H., Yazaki, K., Takahashi, M., dan Tsukii, Y. 1994. Hairpin and dimer structures of linear plasmid-like DNAs in mitochondria of *Paramecium caudatum*. *Curr Genet.* 27:90-94.
- Goddard, J.M. and Cummings, D.J. 1975. Structure and replication of mitochondrial DNA from *Paramecium Aurelia*. *J. Mol. Biol.* Oct 5; 97(4):593-609.
- Griffiths, A.J.F. 1995. Natural plasmids of filamentous fungi. *Microbiol Rev.* 59 :673-685.
- Hermanns, J. and Osiewacz, H.D. 1992. The linear mitochondrial plasmid pAL2-1 of a long-lived *Podospira anserina* mutant is an invertron encoding a DNA and RNA polymerase. *Curr. Genet.* Dec:22(6):491-500
- Oeser, B. and Tudzynski, P. 1989. The linear mitochondrial plasmid pCIK1 of the phytopathogenic fungus *Claviceps purpurea* may code for a DNA polymerase and and RNA polymerase. *Mol. Gen. Genetic.* May; 217(1):132-40.
- Tsuuki, Y. 1993. Plasmid-like DNAs from Mitochondrial in *Paramecium*. International Congress of Protozoology in Berlin.
- <http://protein.toulouse.inra.fr/multalin.html/8> Mei 2001
- http://www.motif.genome.ad.jp/motif-in/motif_markseq_transfac/8 Mei 2001
- <http://ncbi.nlm.nih.gov/8> Mei 2001